

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

## クロトン油混合液による痔疾モデル

### — 吉草酸ジフルコルトロン含有痔疾治療薬 Neriproct と 他剤による抗炎症効果の比較 —

西木 克祐, 西永こずえ, 工藤 大悟, 岩井 克己

日本シェーリング (株) 医薬研究開発本部 研究部\*

(昭和63年6月13日〔持〕)

要約: クロトン油混合液をラット直腸肛門部に塗布し起炎させることにより, 痔疾モデルを作製することを試みた。クロトン油混合液 (水: ビリジン: エチルエーテル: 6%クロトン油=1:4:5:10容) 0.16 ml を投与させた綿球を, 軽度のエーテル麻醉下で6週齢ラット (体重 1450 g) の肛門内に10秒間挿入することが, 浮腫と組織所見に基づいて判断された起炎最適条件であった。浮腫は起炎剤塗布後7~8時間まで直線的に増大し, 24時間以上維持された。起炎剤塗布6時間後の解剖所見では, 起炎剤塗布部位に肉眼的に均一な, しかも再現性のすぐれた炎症像が認められた。また, 光学顕微鏡による組織学的観察により, 浮腫, フィブリンの浸潤, 炎症性細胞の出現, 血管拡張, うっ血, 粘膜上皮細胞の中〜強度の壊死などの所見が認められ, 痔疾の主症状である腫脹とうっ血などを含む炎症症状に対する薬物の作用を検討するためのモデルとして有用であると考えられた。上記モデルで直腸肛門部の湿重量と血管透過性を指標として diflucortolone valerate, hydrocortisone caproate, hydrocortisone の抗炎症効果を測定した結果, 臨床での血管収縮作用が最強である diflucortolone valerate が最も強い効果を発揮した。この事実は本モデルで炎症症状に対する薬効評価を行なうことが可能であることを示唆している。さらに痔疾治療剤 Neriproct®, Scheriproct®, Posterisan Forte®, Posterisan®, Borraginol N® の薬効を同様に測定した結果, Neriproct® と Scheriproct® は予防効果の測定ではほぼ等しく, 他剤よりも有意に強い抗炎症効果を示した。治療効果の測定では Neriproct® は抗炎症効果を示したが, Scheriproct® は効果がなく, その他の製剤ではむしろ炎症を増悪させる作用が認められた。

## 緒 言

痔核は直腸肛門部周辺のうっ血静脈瘤を伴った臨床病変を呈し, 直立歩行をするヒトに特有の疾患であり, 動物を用いた病態モデルの作製はきわめて困難であるといわれてきた。しかし, 痔疾の主な臨床症状が静脈瘤周囲に発生する腫脹・血管病変を含む炎症症状と瘙痒・疼痛などの随伴症<sup>1)</sup>であることを考慮に入れると, 直腸肛門部に炎症を惹起した動物を痔疾モデルとして痔疾治療薬の作用の検討に用いることは, 臨床上の薬効を推定する上で有意義なことである。

既報の痔疾動物モデルはいずれもラットを用いたもので, 直腸肛門部に与えた擦過刺激により発生した浮腫<sup>2)</sup>, 乳酸を肛門粘膜下に投与することにより形成された潰瘍<sup>3,4)</sup>, 灼熱白金耳を直腸肛門部に挿入することにより発生した燃烙痔<sup>5)</sup>などである。これらのモデルは①炎症病態が短期間しか維持されない, ②病態の重篤度

が軽度のまま飽和してしまい, ③再現性に懸点があるなどの欠点の少なくともひとつを備えている。従って, 個体間のバラツキが大きくなり, 薬効評価が困難となることが予測された。

そこで, 著者らは急性炎症惹起に繁用されているクロトン油を含んだ起炎剤<sup>6)</sup>を直腸肛門部に塗布することで, 痔疾モデル作製を試み, 上記の欠点を補完するための条件の設定を行なうと共に本モデルでの組織学的な特徴を明らかにした。併せて, 数種のグルココルチコイドおよび痔疾治療薬の本モデルでの抗炎症効果を検討した。

## 実験材料および実験方法

### 1. 実験動物

Sprague-Dawley 系 SPF ラットを日本クレアより購入し, 室温  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 湿度  $55 \pm 10\%$ , 照明時間 6 時~18 時の条件で固形飼料 (CE-2, 日本クレア) と水を自由摂取できるようにして1週間以上飼育の後に実験に供した。特に断らない限り雌性ラットを用いた。

\* 532 大阪市淀川区西宮原2丁目6番64号

## 2. クロトン油混合液 (CWPE) の調製

既報<sup>2)</sup>に従って起炎剤として蒸留水1容, ビリジン4容, エチルエーテル5容, 6%クロトン油 (エチルエーテル溶液) 10容の混合液を用いた。ビリジンに蒸留水と少量のエチルエーテルを加えて混和した後, 6%クロトン油エチルエーテル溶液を加え, 更に残りのエチルエーテルを加えて激しく振とうしてクロトン油混和液とした。本液を使用16時間以内に調製し冷所保存した。

## 3. 試薬・被験薬

クロトン油は東京化成工業, その他の試薬は特級品を和光純薬より入手した。グルココルチコイドである diflucortolone valerate (DFV), hydrocortisone caproate (HC), hydrocortisone (H) は Schering AG (西ドイツ) より入手した。製剤被験薬として Neriproct® (自社製), Scheriproct® (自社製), Posterisan forte® (マルホ製薬), Posterisan® (同), Borraginol N® (武田薬品工業) を用いた。それらの剤型と薬効成分・含量を表1にまとめた。綿棒は Johnson & Johnson 社のジョンソン綿棒 (約 5mmφ) を購入し, その先端部を綿球として利用した。

## 4. 起炎剤 CWPE 混合液の塗布および浮腫の測定

綿棒の綿球部分に所定容積の CWPE をしみ込ませて, 綿球部分全体を軽いエーテル麻酔下で一定時間ラット肛門内に挿入した。所定の起炎期間の後に断頭, 脱血致死させ, 肛門上皮の毛の輪状生え際より正確に3あるいは15mmの長さに切り出した直腸肛門部の重量を測定した。その重量  $W_{ra}$  と体重  $W_b$  をもとに直腸肛門係数 (Recto-anus coefficient,  $RAC = W_{ra} \cdot W_b^{-1} \cdot 10^3$ )

を算出し, 炎症形成の指標とした。

## 5. 起炎条件の設定

特に記載のない限り, 1群5匹のラットを用いて検討した。

### 1) 浮腫形成の経時変化

0.16 ml の CWPE を綿球にしみ込ませて, 10秒間肛門内に挿入静置し, 2, 4, 6, 8, 24時間後の直腸肛門部湿重量を測定した。その後, 約 80°C の乾熱器中に1時間放置し, 乾燥重量を測定した。

### 2) CWPE の適用量

0.10, 0.13, 0.16, 0.19 ml の CWPE を綿球にしみ込ませ, それを10秒間だけ肛門内に挿入し, 6時間後の浮腫を比較した。

### 3) 綿球挿入期間

0.10 ml または 0.16 ml の CWPE を綿球にしみ込ませて, それを10, 30, 60秒間肛門内に挿入し, 6時間後の浮腫を比較した。

### 4) ラットの週齢

4, 6, 8週齢のラットを用い, CWPE を 0.16 ml しみ込ませた綿球を10秒間肛門内に挿入し, 6時間後の浮腫を比較した。

## 6. CWPE による血管透過性亢進の評価

体重 250~270 g の雌性 Sprague-Dawley 系ラットを用いた。0.16 ml の CWPE を綿棒にしみ込ませて肛門内に10秒間挿入し, 所定屠殺時刻の30分前に1% Evans Blue (EB) 生理食塩水溶液で 20 mg EB/kg を静注した。上記の4に従って直腸肛門部を剔出して湿重量を測定した後, Katayama ら<sup>3)</sup>の方法で剔出組織中

Table 1 Hemorrhoid drugs and their dosage form and ingredients used in this study

Category	Product name	Dosage form	Active ingredient <sup>a)</sup>
Steroid-containing	Neriproct	Cream	Diflucortolone valerate, 0.2 mg; Lidocaine, 40 mg (in 2 g)
	Scheriproct	Ointment	Hydrocortisone caproate, 4 mg; Dibucaine HCl, 5 mg; Clemizole undecylate, 10 mg; Hexachlorophene, 5 mg (in 1 g)
	Posterisan forte	Ointment	Hydrocortisone, 2.5 mg; dead <i>E. coli</i> , $2.66 \times 10^8$ cells (in 1 g)
Steroid-free	Borraginol N	Ointment	Shikon extract, 0.18 mg; Ethylaminobenzoate, 20 mg; Dibucaine HCl, 0.5 mg; Diphenhydramine HCl, 0.5 mg; Cetrimide, 2.5 mg (in 2 g)
	Posterisan	Ointment	Dead <i>E. coli</i> $2.66 \times 10^8$ cells (in 1 g)

a) Cited from the description in the packing insert (specification notice) for each product (except Neriproct).

の EB 含量を測定し静注投与量に対する割合 (%) を算出して、血管透過性の指標とした。

さらに、CWPE 処置1および8時間後の血管透過性と浮腫形成へのヒスタミンの関与を検討するために diphenhydramine HCl (1 mg/kg) を屠殺90分前に、セロトニンの関与を検討するために methysergide dimaleate (1 mg/kg) を屠殺105分前にそれぞれ腹腔内に投与した。DFV, HC, II の原末はネリゾナ・ユニバーサル・クリーム基材 (自社製) に混入して 0.01 (W/W) % に調製し、その 0.15 ml を屠殺120分前に直腸肛門管内に投与した。製剤被験薬は原末クリーム剤と同様に投与した。

#### 7. CWPE による直腸肛門部炎症の組織学的観察

上記のごとく 0.16 ml の CWPE を浸み込ませた綿球を肛門に10秒間挿入し、所定時間後に直腸肛門部を剔出した。この標本を直接ゾーン液で固定した後に常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色を施した顕微鏡標本を作製し、炎症像を光学顕微鏡 (Biophoto, 日本光学工業) で観察、撮影した。対照モデルとして前田と水沢<sup>2)</sup>の方法で擦過刺激痔疾モデルを作製し、上記と同様の顕微鏡標本で組織学的検索を行なった。

### 実験結果

#### 1. CWPE による直腸肛門部炎症の経時変化

CWPE 塗布後24時間までの直腸肛門部湿重量ならびに乾燥重量を図1に示した。湿重量、乾燥重量ともに

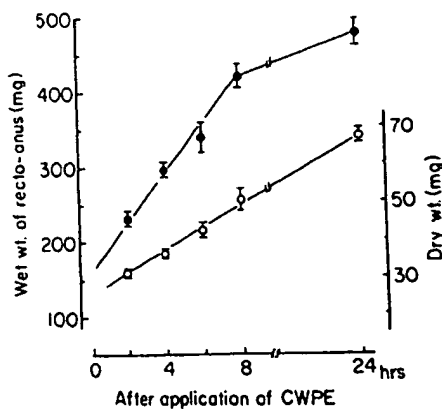


Fig. 1 Time-course of development of inflammation caused by CWPE in the rat rectum. Open and closed circles display dry and wet weights, respectively, of the excised portion of the recto-anus. Each point represents the mean value  $\pm$  S.E. of five animals.

CWPE 塗布後8時間まで直線的に、それ以降24時間後までは僅かに増加した。CWPE 塗布前 (すなわち無処置) の同部湿重量は平均 140 mg であり、塗布6, 24 時間後にはそれぞれ2.4倍 (340 mg), 3.4倍 (476 mg) に達し、後者の時点ではほぼ最高であった。塗布6時間後の湿重量の変化は最高時の約60%に相当しており、薬物の炎症に対する増悪あるいは抑制効果を評価するのに適した起炎期間と考え、以下の実験では起炎期間を6時間に設定した。

#### 2. 綿球挿入時間

CWPE 0.10 ml 又は 0.16 ml を浸み込ませた綿球を挿入し、起炎に適した挿入期間を検討した結果を図2に示した。CWPE 0.10 ml 適用では、挿入期間の延長と共に直腸肛門部の湿重量が増加し、60秒間の挿入期間で最高となり、乾燥重量もこれにほぼ平行した変化を示した。一方、0.16 ml 適用では10秒間で乾湿両重量は最高値を示し、期間延長と共に減少した。0.10 ml, 0.16 ml の両適用量で得られた最高重量を比較すると、0.10 ml 60秒間よりも 0.16 ml 10秒間の刺激条件で高値が得られ、10秒間の刺激を以下の実験に採用した。

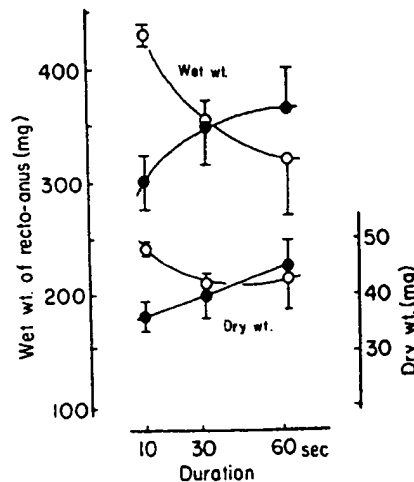


Fig. 2 Effect of duration time of cotton-swabb positioning in the rectum on development of the CWPE-inflammation. Closed and open circles display the CWPE application volumes of 0.10 and 0.16 ml, respectively. Each point represents the mean value  $\pm$  S.E. of five animals.

#### 3. CWPE の適用量

CWPE 0.10, 0.13, 0.16, 0.19 ml を浸み込ませた綿球を10秒間肛門内に挿入し、6時間後に測定した直腸肛

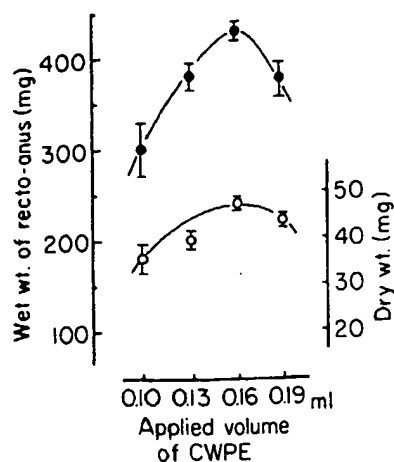


Fig. 3 Determination of the optimal volume of CWPE applied to the rat rectum for developing inflammation. Each plot represents the mean value  $\pm$  S.E. of five animals. Open and closed circles represent the dry and wet weights, respectively, of the excised portion of the recto-anus.

門部の重量を図3に示した。

湿重量、乾燥重量のいずれも適用量 0.16 ml で最高となった。0.10, 0.13 ml の適用量では湿重量がそれぞれ平均 302, 383 mg で、ともに無処置群の2倍以上の重量に達し、十分な起炎効果が認められた。しかし、これらの適用量では CWPE が綿球に均一に行きわたらず、炎症が部位により不均一な例がみられた。0.19 ml 適用の場合には脆弱組織である直腸部の組織崩壊が著しく、筋層が露出し血栓形成のために肉眼的には黒色病変を呈した。浮腫は直腸肛門部よりもむしろその周辺部で著明で、0.16 ml 適用に比して湿重量、乾燥重量ともに低かった。0.16 ml 適用の場合には、CWPE が綿球に均

一に浸みわたり直腸肛門部での炎症は CWPE 塗布部で均質な所見を呈し、従って個体間のバラツキが少なく、図3に見られるように、標準誤差値も最小であった。

#### 4. ラットの週齢

ラットの週齢に基づいて、起炎条件を CWPE 適用量 0.16 ml, 綿球挿入時間 10 秒, 起炎期間 6 時間として、4, 6, 8 各週齢のラットで起炎効果を比較した。体重は上記各週齢で大略倍増した(表2)。また、いずれの週齢でも十分な浮腫が形成され、直腸肛門部の湿重量お

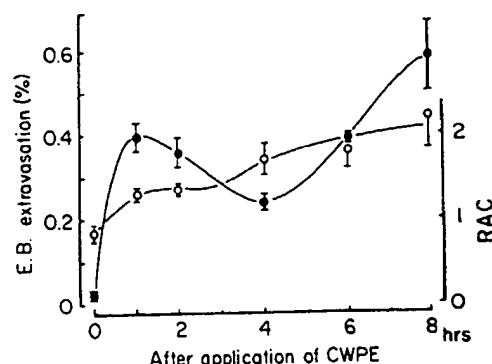


Fig. 4 Time-courses of vascular permeabilization and edema formation caused by CWPE in the recto-anus of rats. Vascular permeabilization was expressed in terms of Evans blue (E.B.) extravasation, which was expressed as the percentage of the rectal content to the i.v. dose of E.B. (20 mg/kg). Edema formation was evaluated through the recto-anus coefficient (RAC, see Table 2 for calculation). Values at zero time are those from animals ( $n=2$ ) not treated with CWPE. The other value are the means  $\pm$  S.E. of 4~6 animals.  $\circ$  and  $\bullet$ , the values of RAC and E.B. extravasation, respectively.

Table 2 Wet weight of the recto-anus portion and recto-anus coefficient in rats of different ages which were treated with CWPE

Age (wks)	Body wt. (g)	CWPE-treated rat		Intact rat	
		Wet wt. (mg)	Coefficient <sup>a)</sup>	Wet wt. (mg)	Coefficient <sup>a)</sup>
4	72 $\pm$ 1	216 $\pm$ 16 (0.07)	3.02 $\pm$ 0.26 (0.09)	113	1.56
6	140 $\pm$ 1	339 $\pm$ 20 (0.06)	2.42 $\pm$ 0.13 (1.05)	135	1.00
8	258 $\pm$ 3	459 $\pm$ 33 (0.07)	1.79 $\pm$ 0.15 (0.08)	180	0.68

The CWPE-treated and intact groups were composed of six and two rats, respectively. Values of the former group are the mean  $\pm$  S.E., and those of the latter group are the mean only. Numbers in the parentheses are the variation coefficient of individual values in each group, which was calculated as a ratio of S.E./mean value. a) Recto-anus coefficient; (Recto-anus wet wt.)/(Body wt.)  $\times 10^3$ .

系で  
く、

用量  
で、  
体重  
れの  
量お

2

RAC

hrs

iliza-  
WPE  
erme-  
Evans  
ressed  
to the  
forma-  
us co-  
ation).  
animals  
other  
nimals.  
extra-

ent

efficient<sup>a)</sup>

1.56

1.00

0.68

values of  
umbers in  
calculated  
x 10<sup>3</sup>.

よび係数 (recto-anus coefficient; RAC) は 4, 6, 8 週齢で両パラメータとも無処置群のそれぞれ約 1.9 倍, 2.5 倍, 2.5 倍の高値を示した。しかし, 4 週齢ジットは, 前項での記述と同様の黒色病変を呈した。

#### 5. CWPE 処置後の血管透過性と浮腫形成

血管透過性は CWPE 処置約 1 時間後まで増加したのち減少し, 再び持続的な増加を呈した (図 4)。その間, 図 1 に示したように直腸肛門部の湿重量は増加し続け, それを反映して RAC も上昇した (図 4)。CWPE 処置 1 時間後に観察された血管透過性亢進と浮腫の増大は diphenhydramine あるいは methysergide 前処置により抑制された (予防効果)。これに対して, CWPE の後に diphenhydramine あるいは methysergide を投与し, CWPE 処置 8 時間後に測定した両薬物の抑制効果は著しく減弱した (治療効果) (表 3 参照)。DFV は上記の予防効果と治療効果の測定で, HC と H に比してより強い抑制作用を示した (表 3)。

製剤被験薬についても同様の試験を行なった結果, 血管透過性亢進に対する予防的な抑制効果は Neriproct® で 60%, Scheriproct® で 55%, Posterisan forte® で 31% の値を示した (表 4)。同じく RAC については Neriproct® で 66%, Scheriproct® で 63% の統計的に有意な低下を, Posterisan forte® と Borraginol N® でわずかな低下を示したが, Posterisan® では効果がほとんどなかった。一方, 治療効果測定の結果, 血管透過性亢進は Neriproct® で 44% の抑制が認められ, Scheriproct® ではほとんど抑制がみられず, 他の薬剤ではむしろさらに悪化する徴候が示された。この血管透過性に対する効果と同様に RAC についても Neriproct® で有意な低下反応 (38%) が見られ, Scheriproct® では効果がほとんどなく, 他の薬剤では増悪反応が観察された。

以上の各種製剤を用いた試験で得られた血管透過性と直腸肛門部重量の変化との関係を図 5 に示したが, 予防

Table 3 Vascular-permeabilizing and edematous responses to CWPE and involvement of histamine and serotonin in these responses in the recto-anus portion of rats

Test substance	1 hr after CWPE		8 hr after CWPE	
	E.B. extra- vasation <sup>a)</sup> %	Inhibi- tion <sup>b)</sup> %	E.B. extra- vasation <sup>a)</sup> %	Inhibi- tion <sup>b)</sup> %
None	0.40±0.05	0	0.59±0.10	0
Cream base <sup>c)</sup>	0.31	23	0.6	-2
Diphenhydramine HCl	0.28	30	0.56	5
Methysergide dimaleate	0.26	35	0.53	10
Diffucortolone valerate	0.20	50	0.15	75
Hydrocortisone caproate	0.26	35	0.45	24
Hydrocortisone	0.29	28	0.52	12
	RAC <sup>a)</sup>	Inhibition <sup>b)</sup> %	RAC <sup>a)</sup>	Inhibition <sup>b)</sup> %
None	1.30±0.07	0	2.20±0.39	0
Cream base <sup>c)</sup>	1.31	0	2.09	9
Diphenhydramine HCl	1.20	26	2.30	-8
Methysergide dimaleate	1.07	61	2.01	15
Diffucortolone valerate	0.90	105	1.27	73
Hydrocortisone caproate	1.14	42	1.88	25
Hydrocortisone	1.30	0	2.13	5

In the "None" group, values are the mean±S.E. of 4~5 animals and in the other group, values are the average of 2 animals. a) Same meaning as that in Fig. 4. b) Difference between values from intact and CWPE-treated but non-medicated ("None" in the Table) animals were taken as 100%. In the intact animals, no E.B. extravasation was observed and RAC was 0.92±0.08 (n=7). c) Nerisona universal cream base.

Table 4 Effects of Neriproct and other hemorrhoid drugs on vascular permeabilization and edema formation caused by CWPE<sup>a)</sup>

Treatment	1 hr after CWPE		8 hr after CWPE	
	E.B. extravasation (%)	Inhibition <sup>b)</sup> (%)	E.B. extravasation (%)	Inhibition <sup>b)</sup> (%)
Vascular permeability				
None	0.50±0.03	0	1.73±0.14	0
Neriproct	0.25±0.03**	60	1.00±0.10	44
Scheriproct	0.27±0.03**	55	1.81±0.13	-5
Posterisan forte	0.37±0.03*	31	2.17±0.23	-27
Posterisan	0.46±0.04	10	2.70±0.29	-59
Borriginol N	0.45±0.03	12	2.07±0.25	-27
Treatment	RAC		RAC	
	RAC	Inhibition <sup>b)</sup> (%)	RAC	Inhibition <sup>b)</sup> (%)
Inflammation				
None	1.72±0.09	0	3.30±0.21	0
Neriproct	1.31±0.07	66	2.47±0.17	38
Scheriproct	1.33±0.05	63	3.54±0.17	-11
Posterisan forte	1.60±0.11	19	4.34±0.35*	-47
Posterisan	1.78±0.08	-10	4.67±0.28	-62
Borriginol N	1.60±0.09	19	3.86±0.37	-26

a) Values are the mean±S.E. (n=7~8). b) Inhibition % was calculated from the mean values, taking the difference between intact control (EB extravasation, 0.09±0.01%; RAC, 1.10±0.03 mg/g) and none group as 100%. \* P<0.05, \*\* P<0.01, significant difference from the none group (CWPE control).

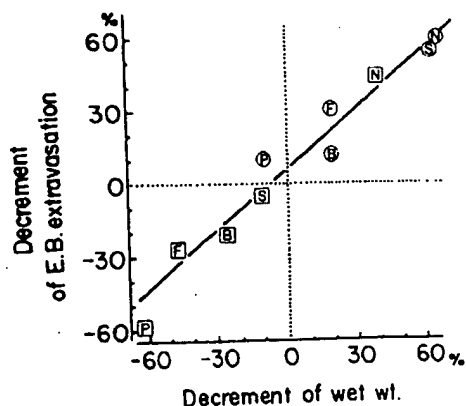


Fig. 5 Correlation of E.B. extravasation and wet weight of the recto-anus portion irritated by CWPE. The data in this Figure were all cited from Table 4. ○, represent the values for prophylactic effects (i.e., 1 hr after CWPE); □, the values for therapeutic effects (i.e., 8 hr after CWPE). Letters in the open symbols indicate the following: N, Neriproct; S, Scheriproct; F, Posterisan forte; P, Posterisan; B, Borriginol N.

効果試験, 治療効果試験で相関係数はそれぞれ 0.94, 0.98 であった。両試験での測定例を総和した時の相関係数も約 0.98 であった。

#### 6. 直腸での CWPE 炎症の組織学的観察

正常ラットの直腸では図 6 に示したごとく, 後出の炎症腸管に比して輪状筋 (ICM) と粘膜層 (MM) の間の粘膜下組織は極くわずかに認められるに過ぎず, 粘膜, 輪状筋, 縦走筋 (OLM), 漿膜 (S) 周縁に浮腫様所見は認められない。これに対して, CWPE (0.16 ml 6 時間) 処置した直腸部では図 7 A に典型例を示したごとく, 粘膜層の組織はほぼ維持されているものの, 組織全体に浮腫が著明であった。殊に粘膜下組織, 漿膜周縁での浮腫による膨潤が著しく, 正常粘膜にみられる襞は消失し, 粘膜上皮細胞の活性が低下している所見を呈した。さらに, 強拡大の観察 (図 7 B) により粘膜下組織での血管拡張 (うっ血) のみならず, 白血球やフィブリンの浸潤がみられた。粘膜層でも浮腫が顕著に認められ, リーベルキーン腺を形成する粘膜上皮細胞の壊死像も観察された。

一方, 前田と水沢<sup>2)</sup>の方法で擦過刺激により惹起され

た直腸肛門管炎症(図8A, B)では, 粘膜組織の壊死が顕著ではないが, フィブリンの漏出過多が特徴的であ

った。図8Bからフィブリン漏出が粘膜固有層, 粘膜下組織はもとより, リーベルキーン腺内にまで及んでいることがわかる。浮腫の程度は CWPE 刺激に比して総体的にやや軽度であるが, 粘膜下組織と漿膜周縁部に著明であることが観察された(図8A)。

### 考 察

グルココルチコイドの局所的効力を検討するために広く用いられている動物の外皮系は痔疾用剤の臨床投与部位であるヒト粘膜とは組織学的, 機能的に著しい相違がある。従って前臨床での薬理作用を検討するに当たって, 臨床に近似した投与部位での薬効評価が必要であると考えられた。そこで, 炎症症状に再現性があり, かつ容易に多数の動物を短時間で処理できる可能性があるとの観点から, 痔疾モデルとして CWPE による直腸肛門部炎症動物の作製を試みた。

起炎剤塗布条件を一定にするために, 一定の固さ, 外径, 長さの綿球が必要であったが, 著者らは市販されて

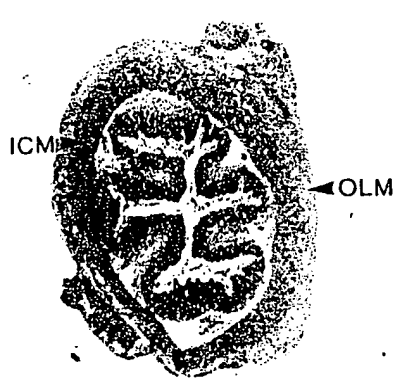


Fig. 6 Photomicrographs of a cross-section of the rectum in control rats. The rectum was abraded once by a cotton swab soaked with saline. A, Low-power photomicrograph; One division of the scale is 0.1 mm. B, Observation under a 100-fold magnification. The crypts of Lieberkuehn (CL) are cut in oblique section. They are seen to extend down to the muscularis mucosa (Mm). ICM, inner circular muscle; MM, mucous membrane; OLM, outer longitudinal muscle; S, serosa. See the text for details.

いぞれ 0.94.  
した時の相関

く, 後出の炎  
(MM) の間の  
ぎず, 粘膜,  
浮腫様所見は  
(6 ml 6 時間)  
たごとく, 粘  
組織全体に浮  
周縁での浮腫  
膜は消失し,  
呈した。さら  
組織での血管  
ブリンの浸潤  
られ, リーベ  
E 像も観られ

より惹起され





Fig. 7 Photomicrographs of a cross-section of the rat rectum treated with CWPE. A, Low-power photomicrograph showing a typical whole view of the cross section; An extraordinary mass of edema was formed. B, Edema formation, congested vessels (V), fibrin leakage and leucocyte invasion (L) in the submucosal space; This photograph was taken through a microscope at a 40-fold magnification. C. Observation under a 200-fold magnification. One could find severe necrosis of the epithelial cells of the Lieberkuhn crypts (CL), congested vessels, and invasion of leukocytes. The crypts are cut in longitudinal section. In the mucous membrane also, edema formation is remarkable. Scale and other abbreviations are the same as those in Fig. 6.

いる綿棒先端を利用した。これに CWPE 0.16 ml を浸み込ませて6週齢ラットの肛門内に10秒間挿入し、6時間後に検定することで、再現性がよく、直腸肛門部には

ほぼ均一に生じる炎症を得ることが出来た。

CWPE 適用量の増加、綿球挿入期間の延長、あるいは肛門管径の小さな若齢ラットの使用などにより、上記の起炎条件以上に刺激強度を強めると、組織が黒色化し、壊死が強く進んでいることが肉眼的に観察され、生物学的機能がすでにほとんど失われていることが認められた。逆に刺激強度を減弱すると、炎症所見に均一性が失われる結果、再現性が乏しくなった。従って、後二者の条件は薬効を検討するのに不適當であると判断された。

クローン油単独投与による胸膜炎モデルでは一過性の血管透過性上昇がみられ、その現象には胸水中のヒスタミンとセロトニンが調節的な役割を果たしているといわれている<sup>9)</sup>。

これに対して、上記のような条件で CWPE により惹起された直腸肛門部での血管透過性上昇は双峰性の反応時間経過を示した。第1のピークは diphenhydramine あるいは methysergide で部分的ではあるが抑制を受ける事実と時間的推移の同等性から胸膜炎モデルでの血管

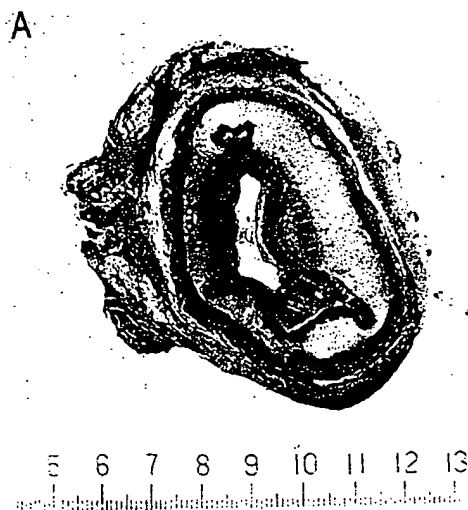


Fig. 8 Microscopic observation of fibrin exudation into layers of the rat rectum inflamed by abrasive irritation. A, Low-power photomicrograph. Edema formation was less extraordinary than in the CWPE-treated rectum shown in Fig. 7. B, Observation under a 100-fold magnification. Severe fibrin exudation took place in all areas of the cross-section. Scale and abbreviations are the same as those in Fig. 6.

透過性の変化に対応する反応であると考えられる。第2のピークは diphenhydramine あるいは methysergide ではほとんど抑制を受けない。直腸肛門部ではクロトン油単独投与で炎症性病変はほとんど惹起されず、また CWPE からクロトン油を除いた液では非浸出性の紅斑が形成されるに過ぎない(西永ら、未発表データ)。従って、CWPE 炎症では CWPE の成分(クロトン油、ビリジソ、エチルエーテル)の相乗作用がその起炎反応の引き金として機能すると推測される。またヒスタミンとセロトニンのみならず、他の因子も起炎反応に寄与しており、その複合効果で炎症像が持続的に維持されるのであろう。炎症の持続性について RAC を指標として前田と水沢<sup>2)</sup>の擦過刺激痔疾モデルと比較すると、CWPE モデルは RAC が初期値の3~4倍に達する上に、それが起炎剤塗布24時間後でも維持されるのに対し、擦過刺激モデルでは RAC が刺激後約3時間で初期値の約1.8倍に達したのちに減少する<sup>2)</sup>。従って CWPE モデルでは被験薬の予防効果と治療効果を測定するのに便利である。

この痔疾モデルでは、フィブリンや炎症性細胞の浸潤などの組織学的特徴のほかに、血管拡張、うっ血、粘膜上皮細胞の強度な活性低下ないしは壊死、そして顕著な浮腫形成がみられる(図7)。これらの組織学的所見は上記の擦過刺激痔疾モデルと比較して(i)粘膜上皮細胞の壊死が強度にまで至る、(ii)浮腫形成が強度にまで至る、(iii)フィブリンの浸出が軽度である、(iv)末梢血管でのうっ血状態を引き起こし、それを組織学的に鑑別することができる、などの相違点がある。クロトン油中に含まれる phorbol ester (PE) は以下の各種薬理作用を持っている。すなわち、(i)白血球<sup>10)</sup>や肥満細胞<sup>11)</sup>からのヒスタミン遊離を誘発する、(ii)血小板でのセロトニン遊離と凝集を誘発する<sup>12,13)</sup>、(iii)多核白血球での  $O_2^-$  生成を促進する<sup>14)</sup>、(iv)  $\alpha_1$ -受容体を抑制する<sup>15)</sup> ことにより血管を弛緩する<sup>16)</sup> などである。これらの薬理作用が上記の病理学的組織変化の主因であると考えられる。

本モデルで炎症重篤度の定量的指標として用いた直腸肛門部湿重量の増加は乾燥重量の増加を伴っており、CWPE で惹起された反応が単にイオンや水分の移行のみによるのではないことを示している。上述のように組織学的検索で炎症部位でフィブリンや炎症細胞の著明な浸潤が観察されており、これらが乾燥重量増加の一因であると考えられる。一方、PE は protein kinase C を介して細胞分裂を促進する<sup>17,18)</sup> ことが知られているが、生

理的条件下では分裂活性が最も高い粘膜層で CWPE 処置後その活性がむしろ低下している組織学的所見を呈しており、細胞増殖が乾燥重量増加の原因となっている可能性は否定されよう。

上記の諸性質を備えた CWPE 痔疾モデルのラットに DFV, HC, H を投与した結果、予防効果、治療効果のいずれの測定でも  $DFV > HC > H$  の強さの順で炎症を抑制した。この結果は臨床でのグルココルチコイド作用が "very strong" に分類されている  $DFV^{19)}$  の薬効がこの痔疾モデルの抗炎症効果にも反映されており、本モデルでの薬効検定が可能であることを示している。

そこで、CWPE モデルを用いて、Neriproct<sup>®</sup>, Scheriproct<sup>®</sup>, Posterisan forte<sup>®</sup>, Posterisan<sup>®</sup>, Borraginol N<sup>®</sup> などの痔疾治療製剤について血管透過性と浮腫に対する抑制効果を測定した。DFV を含有する Neriproct<sup>®</sup> は予防効果、治療効果いずれの測定でも最も強い効力を発揮した。HC を含有する Scheriproct<sup>®</sup> がそれに次ぐ強い予防効果を示したが、治療効果の測定ではほとんど効力を示さなかった。他剤の治療効果の測定ではむしろ増悪する反応がみられ、或る種の臨床症状では薬剤によっては増悪される可能性を示すものとして注目される。これらの予防効果と治療効果が測定を通して血管透過性と浮腫について広い範囲で測定値が得られ、両パラメータの間に強い相関性が認められた。この事実は直腸肛門部重量の上昇に細胞増殖が関与していないとの上述の推論を間接的に支持し、また、いずれの薬剤も本質的には血管透過性の変動要因の調節に関与することを示唆している。

以上のごとく、CWPE 痔疾モデルは①モデル動物作製に際して短時間内に多数の動物を処理することが出来る、②病変の再現性がよい、③病変程度が重度にまで達し、そのため病変の指標となる直腸肛門部の重量変化が大きい、④病変が短時間に進展し、比較的長く持続する、⑤組織学的にうっ血所見が観察される、などの特色がある。従って、既報の各種痔疾モデルに比して多くの利点があると思われる。また、痔疾での臨床所見の特色のひとつといわれる静脈系のうっ血に対する効果を推定できる可能性もある。このモデルで Neriproct は数種の代表的痔疾治療製剤よりも強い抗炎症効果を示し、痔疾の局所保存療法での有用性が期待される。

## 文 献

- 1) 北原折夫: 薬局 25, 585 (1974)
- 2) 吉雄敏文: 薬理と治療 5, 263 (1975)
- 3) 前田幸英, 水沢英市: 薬理と治療 5, 1281 (1977)

- 4) 柴田 九, 山竹美和, 天谷幸子, 福島正子: 薬学雑誌 95, 539 (1975)
- 5) 林 元英, 鈴木常正, 浅野恭一, 田中浩爾, 菅原勉, 末永栄一: 応用薬理 16, 503 (1978)
- 6) 佐野章子, 野島光子, 長野 聖, 山口敏二郎: 薬学会講演要旨集 (3), p. 185 (1974)
- 7) 田中雄四郎, 前田昌樹, 中村圭二: 応用薬理 12, 809 (1976)
- 8) Katayama, H., Shinoya, H. and Ohtake, S.: Microbiol. Immunol. 22, 89 (1978)
- 9) Kikuchi, M. and Ohnishi, S.: Japan. J. Pharmacol. 39, 467 (1985)
- 10) Schleimer, R.P., Gillespie, E. and Lichtenstein, L.M.: J. Immunol. 126, 570 (1981)
- 11) Sagi-Eisenberg, R., Roreman, J.C. and Shelly, R.: Eur. J. Pharmacol. 113, 11 (1985)
- 12) Zucker, M.B., Jroll, W. and Belman, S.: J. Cell Biol. 60, 325 (1974)
- 13) Mufson, R.A., Kulkarni, P., Eakin, K.E. and Weinstein, I.B.: Cancer 39, 3602 (1979)
- 14) Lehrer, R.I. and Cohen, I.: J. Clin. Invest. 68, 1314 (1981)
- 15) Coverd, S., Schwarz, K.R., Graham, R.M. and Garcia-Sainz, J.A.: J. Biol. Chem. 261, 520 (1986)
- 16) Danthuluri, N.R. and Deth, R.C.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 125, 1103 (1984)
- 17) Jouraine, J., Hadden, J.W., Jouraine, F., Hadden, E.M., Esten, R. and Good, R.A.: J. Exp. Med. 145, 460 (1977)
- 18) Abb, J.G., Bayliss, J. and Deinhardt, F.: J. Immunol. 122, 1639 (1979)
- 19) 竹田克之, 橋本充邦, 内田尚之: 医薬ジャーナル 22, 295 (1985)

**Abstract**—Croton oil-induced hemorrhoid model in rat: Comparison of anti-inflammatory activity of diflucortolone valerate with other glucocorticoids. Katsuyuki NISHIKI, Kozue NISHINAGA, Daigo KUDOH and Katsumi IWAI (Department of Research, Nihon Schering K.K., 2-6-64, Nishimiyahara, Yodogawa, Osaka 532, Japan). *Folia pharmacol japon.* 92, 215~225 (1988)

A hemorrhoid model was prepared by means of application of croton oil onto the recto-anus of rats. Cotton swab soaked with the inducer, which consisted of water, pyridine, diethylether and 6% croton oil in diethylether, was inserted into the anus. The following conditions were found to be optimal for preparing the model: cotton swab containing 0.16 ml of the inducer solution was applied to the anus of a 6 week-old rat (body wt. about 140 g) for 10 sec. The edema developed linearly until 7-8 hr after application, and the severity of the edema was sustained almost constantly for more than 24 hr. Macroscopic observations at 6 hr p. a. revealed homogeneous and consistent inflammation in the recto-anus applied region. Histological observation showed appearance of edema, infiltration of fibrin, inflammatory cells, vasodilatation, blood congestion and medium to high degrees of necrosis in the mucosal epithelium. Thus this model was useful for evaluating the effect of anti-hemorrhoidal drugs on intumescence and vasodilatation. The efficacy of diflucortolone valerate, hydrocortisone caproate and hydrocortisone was evaluated in this model. Wet weight and vasopermeability increased by the inducer was suppressed strongly by simultaneous application of the corticoids, and the degree of suppression was parallel with the potency of the glucocorticoid activity. Compared to Scheriproct®, Posterisan forte®, Posterisan® and Borraginol N®, Neri-proct® showed the strongest effects in the protection against and treatment of the experimental hemorrhoid. Scheriproct®, which was less active than Neri-proct®, was also found to have higher efficacy than the others.